

· 综述 ·

原癌基因 Pokemon 与肿瘤研究新进展

聂国辉 综述, 魏明辉 审校

(深圳市第二人民医院 耳鼻咽喉科, 广东 深圳 518035)

关键词: 原癌基因; Pokemon; 癌症

中图分类号: Q786

文献标识码: C

文章编号: 1007-1520(2012)03-0239-05

Pokemon 蛋白(也称为 LRF、FBI-1、OCZF、TIP)是转录抑制因子 POK 家族的成员,由 ZBTB7 基因编码,最初作为人类免疫缺陷病毒短转录诱导物连接因子-1(FBI-1)被克隆纯化和鉴定,它也是重要抑癌基因可变读框基因(alternative reading frame, ARF)的中心调节因子,参与一些细胞基因转录的调节及细胞分化。研究表明, Pokemon 不仅调节 HIV-1 Tat 的转录过程,也涉及到人和鼠的脂肪形成;作为转录因子调节很多基因编码的蛋白的表达,如细胞外基质胶原蛋白 I、II、IX、X 和 XI、纤连蛋白、弹力蛋白、人寡聚基质蛋白、ARF 肿瘤抑制基因、C-fos 和 C-myc 癌基因等,在胚胎发生、细胞分化、凋亡及肿瘤形成中起重要作用^[1]。对 Pokemon 基因的进一步研究为肿瘤的诊断和治疗提供新的途径和方法。

1 Pokemon 基因与肿瘤的发生

Maeda 等^[2]在经典的早期胚胎成纤维细胞(MEFs)生长和转化试验中发现,通常强力的癌基因组合如 E1A + H-ras^{V12}、Myc + H-ras^{V12}及 T-antigen + H-ras^{V12}对野生型 MEFs 可引起明显的细胞增殖反应,在软琼脂集落形成实验中多种癌基因联合可以导致细胞分化能力增强,但是在 Pokemon 基因缺失的 MEFs 中却没有明显的细胞增殖和分化。联合感染 Pokemon 和 Myc, T-antigen 和 H-ras^{V12}则可以显示出明显的增殖和分化优势。因此推断, Pokemon 可能是

一种原癌基因,且位于多种原癌基因上游,它在癌基因转化过程中起到关键性作用^[2-3]。目前的研究表明,其可能的致癌机制如下。

1.1 ARF-MDM2-p53-p21 径路

已知 POC 家族蛋白通过其 POZ 结构域和其他蛋白结合形成联合抑制复合体,从而起到转录抑制的作用。可以推测 Pokemon 正是通过对肿瘤抑制基因和凋亡诱导因子的抑制而起作用。通过 CAST 分析的方法确定 Pokemon 的 DNA 结合序列,这是一个富含 G-C 的序列,和转录因子 Sp1 有一定的相似性。尝试在肿瘤抑制基因 ARF 的启动子上定位几个潜在的 Pokemon 结合位点,来检测 Pokemon 是否抑制其活性。通过 ARF 荧光素酶标记和染色质免疫共沉淀分析发现 Pokemon 在体内和 p19ARF 启动子(人类同源物为 p14ARF)直接结合并能抑制它的活性。在 Pokemon 基因缺乏时, p19ARF 在培养休克和致癌转化试验中明显升高。同为 Ink4a-Arf 部位编码的另外一个肿瘤抑制基因 p16Ink4a 在 Pokemon 灭活的 MEFs 中并不升高^[3-4]。进一步研究表明 Pokemon 灭活引起的 MEFs 的生长障碍和对致癌转化的耐受可以被 p19ARF 的丢失逆转。研究结果提示 Pokemon 是 p19ARF 的特异性抑制剂, Pokemon 的丢失导致 ARF 的异常上调,并最终导致早熟细胞的衰老和对致癌刺激的无应答。体内 p19ARF 与 mdm-2 之间相互作用,可以抑制 p53 的降解并上调其转录活性。因此 Pokemon 基因的作用模式可能为: Pokemon ↑ → ARF ↓ → MDM2 → p53 ↓ → 肿瘤发生。研究还发现转录调节物 E2F1 可以激活和活化 ARF, 而 Pokemon 能有效地抑制这种作用。值得指出的是, Pokemon 对 ARF 的

作者简介: 聂国辉, 男, 主任医师。
通讯作者: 聂国辉, Email: nghui@21cn.com.

抑制活性需要 POZ/BTB 结构和锌指结构共同参与。

尽管 FBI-1 被认为是肿瘤抑制基因 ARF 的转录抑制中的关键转录抑制因子,并间接导致 p53 的失活。Choi 等^[5]对 p53 径路的转录抑制的研究则显示, FBI-1 抑制 ARF、HDM2 和 p21 CIP1 (P21) 的转录而非 p53。相对于 p53, FBI-1 对 p21 显示出更强的抑制效果。研究显示 FBI-1 作为 ARF-HDM2-p53-p21 径路的主要控制因子,转录和抑制 p21 上游调节因子,最终影响细胞周期停滞因子 p21。FBI-1 作为 p53 和 Sp1 的竞争性转录抑制因子,能够和 P21 近端的 Sp1-3 GC-box 和远端的 p53 应答成份相结合。其抑制效应的发挥既可以通过和 p53 和 Sp1 竞争性结合抑制,还可以和辅阻遏因子 mSin3A、NCoR 及 SMRT 相互作用使 p21 启动子 Ac-H3 和 Ac-H4 组氨酸脱乙酰化从而起到抑制作用。

1.2 Rb-E2F 径路

Rb 基因是细胞周期中调节 G1/S 检查点的重要抑癌基因,当 Rb 在去磷酸化状态时,和 E2F 家族蛋白形成复合体,抑制基因的转录。Jeon 等^[6]研究发现 FBI-1 蛋白能够和 Rb 基因启动子的 4 个 G-C 富集启动子成份 (FREs) 和两个 Sp1 结合位点-GC-box1 和 GC-box2 相结合,而且第 3 个 G-C 富集启动子成份 FRE3 也是 Sp1 的结合成份。FBI-1 不仅通过和 FREs 结合直接抑制 Rb 基因的转录,还可以通过和 Sp1 竞争性结合 GC-box2、FRE3 从而抑制 Rb 基因的转录。FBI-1 和 Rb 基因的 FREs 和 GC-box 等成份的结合后,通过其 POZ 结构域招募联合抑制-组蛋白脱乙酰酶复合物,使 Rb 基因启动子上的 H3、H4 组氨酸脱乙酰化从而抑制 Rb 基因的转录。

1.3 其他径路

在人类肿瘤中,ARF/p53 径路常常是失活的,与实体肿瘤相比,虽然弥漫大 B 细胞淋巴瘤 (DLBCL) 中 ARF/p53 径路的突变相对少见,但 ARF 和 p53 均突变的小鼠通常会发生淋巴瘤^[7];逆转录 PCR 的方法分析一组 NLBCL 的病例显示:Pokemon 的高表达和 p14ARF 的低表达相关,揭示 Pokemo 抑制 ARF 的表达在 DLBCL 中的重要性。鉴于 Pokemon 也在一些实体肿瘤中如结肠癌、膀胱癌中高表达,而在这些

肿瘤中 ARF/p53 径路功能则常常是丧失的。据此可以推测, Pokemon 还有多种附加的靶基因来使其致癌活性得到实现^[2]。值得注意的是 Kaiso (另一 POK 家族成员), Yoon 等^[8]发现, Kaiso 能特异连接甲基化 DNA 序列并提高对靶基因的抑制。推测 Pokemon 可能与其他 BTB/POZ 结构域形成同源或异源复合体,通过对靶基因的外遗传控制 (如启动子超甲基化) 实现其癌基因功能。近来研究还发现含 BTB/POZ 结构域蛋白与 Cullin E3 连接酶功能相关, POZ 结构域蛋白家族作为 Cullin3 E3 泛素化连接酶复合体的结合体而发挥作用,因此, Pokemon 可能又通过蛋白泛素化来调节其靶点和通路^[9];同时 Pokemon 基因的活性也可以被泛素化调剂^[10]。

目前在人类中已经发现了超过 60 个 POK 蛋白,对于这些蛋白之间的关联我们仍然知之甚少。POK 蛋白可通过 POZ/BTB 结构域形成同源或异源复合体 (如 PLZF/BCL6, Pokemon/BCL6 等),这些蛋白可以共享类似的 DNA 结合序列 (如 PLZF 和 FAZF), POC 家族蛋白的功能网络可能比我们预料的更复杂、更有活力^[11]。而目前发现人体内含有的 POZ/BTB 结构域的蛋白超过 100 个,再考虑到 POC 蛋白和这些蛋白之间的相互作用,可能导致他们在细胞功能中的更加多样性。

2 Pokemon 在肿瘤中的表达与头颈部肿瘤

研究表明 Pokemon 在多种组织中均有表达,关于其在细胞内的定位,国内外的研究不尽相同。由于 FBI-1 在其羧基端存在一个二裂深的核定位信号序列,因此推论 FBI-1 的亚细胞定位应位于细胞核。1999 年, Morrison 等^[12]首次应用免疫荧光显微技术分析了 FBI-1 的亚细胞定位,发现 FBI-1 的确定位于细胞核。而非溶性 FBI-1 则显示出了一个新的核周点状定位模式,也有少部分定位于细胞质^[13]。2005 年, Maeda 等^[2]利用 Pokemon 单克隆抗体 13E9 组织芯片技术检测它在人类肿瘤中的表达,发现 Pokemon 在某些类型的人类乳腺癌、肺癌、结肠癌、前列腺癌和膀胱癌中过表达。目前人们已经在乳腺癌、肺癌、结肠癌、肾癌、宫颈癌、淋巴瘤、前列腺癌和膀胱癌中发现 Poke-

mon 的异常表达^[14-17],主要位于细胞核中,也有部分研究发现其定位于细胞质中^[15-16]。研究还发现在一些良性病变和正常组织中也出现 Pokemon 的表达,但呈现正常组织-慢性炎症-良性肿瘤-恶性肿瘤表达逐渐增强的特点^[16]。如 Hoatlin 等^[11]通过免疫组化显示, Pokemon 在 60%~80% 的弥漫性大 B 细胞淋巴瘤和滤泡性淋巴瘤中表达。崔明等^[16]采用免疫组化 SP 法检测 52 例乳腺癌、20 例癌旁正常组织和 20 例乳腺增生组织 Pokemon 基因的表达情况,并对其与临床病理特征的关系进行分析。发现 Pokemon 蛋白表达于乳腺癌细胞核和细胞质,乳腺癌细胞核 Pokemon 蛋白高表达率为 71.2%,显著高于癌旁组织的 40% 和乳腺增生组织的 25%;乳腺癌组中有腋窝淋巴结转移组的 Pokemon 基因的表达率明显高于无腋窝淋巴结转移者,说明 Pokemon 的高表达可能和淋巴结转移有关。Pokemon 蛋白在细胞的定位及具体作用机制还不是很清楚,需要进一步研究。

关于头颈部肿瘤的 Pokemon 基因的表达情况目前研究较少,高伟等^[17]采用免疫组化 SP 法检测了 86 例鼻咽癌和 30 例慢性鼻咽炎患者的 Pokemon 基因的表达情况,发现 Pokemon 在 86 例鼻咽癌患者中高表达(77.9%),明显高于慢性鼻咽炎组(23.3%),Pokemon 表达与鼻咽癌临床分期和淋巴结转移有相关性,说明 Pokemon 在鼻咽癌的发生、发展与转移中扮演重要角色。采用 RT-PCR 的方法检测了 56 例鼻咽癌和 30 例慢性鼻咽炎患者标本的 Pokemon 基因 mRNA 的情况,结果显示鼻咽癌组织中 Pokemon 基因 mRNA 呈阳性表达(91.9%),而鼻咽部慢性炎症组织中无表达。

3 Pokemon 可能的调节基因

尽管目前已经在多种肿瘤组织中检测到 Pokeman 基因的过度表达,关于 Pokemon 基因的生物学功能也进行了较多的研究,然而有关 Pokemon 基因的调节机制还研究较少,目前的研究显示有关 Pokemon 基因可能的调节机制有如下几种。

3.1 多药耐药基因 1

由多药耐药基因 1 (MDR1) 编码的 P 糖蛋

白是一个跨膜载体,在药物动力学中有重要作用。He 等^[18]研究发现 Pokemon 基因的启动子活性、mRNA 和蛋白可以被 P 糖蛋白抑制。染色质免疫沉淀分析发现 P 糖蛋白可以和 Pokemon 基因的启动子结合从而抑制 Pokemon 基因的转录,而且通过应用以 p53 为靶点的小干扰 RNA (siRNA) 转染 MCF-7 细胞系或应用 p53 突变的 MDA-MB-23 细胞研究发现, P 糖蛋白可以通过 p53 的表达抑制 Pokemon 基因的转录活性,而且应用免疫沉淀分析可以在体内检测到 p53 和 P 糖蛋白结合,提示 P 糖蛋白通过 p53 的出现调节 Pokemon 基因的表达,是一个有效的调节因子。

3.2 宫颈肿瘤抑制基因 3

真核生物翻译延长因子 1A (eEF1A) 是一种 50kd 的单体,在翻译过程中携带氨酰 tRNA 到核蛋白体的 A 点,涉及到胚胎形成、癌变、细胞增殖、细胞骨架形成等细胞过程。而宫颈肿瘤抑制基因 3 (CCS3) 被认为是 eEF1A 的同源异构体,可以与 BTB/POZ 结构域家族的转录抑制因子 PLZF 相互作用,促进 PLZF 的转录抑制效果。Choi 等^[19]通过免疫共沉淀、SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)、MALDI-TOF Mass 分析技术等发现 eEF1A 和 FBI-1 形成一个复合物。GST 融合蛋白沉降分析显示 FBI-1 通过其锌指结构和 POZ 结构域直接与 eEF1A 和 CCS3 相互作用,CCS3 促进了 FBI-1 引起的 p21CIP1 基因的转录抑制效果。

3.3 MicroRNA

MicroRNAs 是长度在 20~22 核苷酸的短 RNA,能负性调节其靶基因的表达,在组织细胞的发生、增殖、凋亡及肿瘤发生中有重要作用。Laura 等^[20]研究发现 LRF 基因受到 miR-20a 的转录后调控;作者通过报告基因分析方法发现 miR-20a 和 LRF 基因的 3'端非编码区 (3'UTR) 相互作用。为了证实 miR-20a 和 LRF 的 3'UTR 的相互作用,作者通过直接转染或逆转录病毒感染的方法提高野生型小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 和 LRF 基因敲除的 (LRF-null) 胚胎成纤维细胞的 miR-20a 的表达水平,结果观察到 LRF 下降、p19ARF 升高、细胞增殖受抑制和细胞老化。通过比较野生型 MEF 和 LRF-null 型 MEF 的 miR-20a 活性,结果提示 LRF 是 miR-20a 引起的细胞老化的主要介导因

子,其他靶基因起协同作用。LRF 基因的下调和 p19ARF 的诱导通常伴随着 E2F1 基因的下调和 p16 的升高,因而作者提出这一系列基因协同作用最终完成 miR-20a 引起的 MEF 细胞的老化。细胞老化作为细胞凋亡的另一种选择,最近被重新评价为一种肿瘤抑制机制;从这方面来看,新的生理性"衰老诱导物"的发现可以作为抗癌药物研究的有前景的分子。

Davies 等^[21]研究发现,LRF 还是癌基因 LAZ-3/BCL-6 的潜在的靶点。

4 Pokemon 与基因治疗

综上所述,Pokemon 基因在胚胎形成、细胞的增殖、分化、凋亡和肿瘤的发生中起着关键而多样的作用,而这些作用之间并不是孤立发生的,各种作用之间存在着各种各样的联系。它是 ARF-HDM2-p53 径路和 Rb-E2F 径路的主要调节因子,在肿瘤的形成中起重要作用。其发生作用位于很多抑癌基因和癌基因的上游,且人体很多肿瘤存在 Pokemon 基因的高表达,特别是腺癌和鳞癌。因此,Pokemon 成为近年来肿瘤基因治疗有吸引力的重要靶点。基因治疗的方法有多种,其中 RNA 干扰(RNAi)是使特定基因沉默的一个有效方法,为基因治疗提供了一个有前景的工具。

诱导干扰现象的产生首先需要向细胞内注入 siRNA 或者在细胞内表达 siRNA。目前,几种不同的启动子,如 U6、H1、tRNA 和 CMV 常常被用来控制 RNAi 表达载体的抑制效果,Weiwei 等^[22]以 Pokemon 基因为靶基因,分别构建了由 tRNAlys 启动子和 CMV 增强 tRNAlys 启动子控制的发夹结构 RNA(shRNA)载体,并比较了不同启动子载体的抑制效果。发现与 tRNAlys 启动子和 U6 启动子载体比较,CMV 增强 tRNAlys 启动子载体能够更有效地在 mRNA 水平和蛋白质水平使 Pokemon 基因沉默,研究还发现 Pokemon 基因的沉默抑制了乳腺癌细胞系 MCF-7 细胞的增殖,但并没有观察到诱导 MCF-7 细胞凋亡。因而认为 CMV 增强 tRNAlys 启动子是使细胞内表达 siRNA 的有力工具,能更有效地抑制靶基因。Tian 等^[23]在宫颈癌模型中进行了采用 RNAi 的方法沉默 Pokemon 基因的试验,为寻求肿瘤特异性抑制和 siRNA 的

持久表达,作者采用了精氨酸-谷氨酸-天冬氨酸(RGB)肽链和多聚赖氨酸(K18)融合肽链包裹重组逆转录病毒的方法,制作表达以 Pokemon 为靶基因的 siRNA 的载体,以一定比例混合后形成稳定而一致的纳米颗粒,这种纳米颗粒抑制宫颈癌细胞 SiHa 的增殖和侵袭,促进 SiHa 细胞的凋亡。其对肿瘤生长的抑制效果比表达 siRNA 的重组逆转录病毒更有效,这种新的治疗方法有可能应用于更多的肿瘤治疗的研究。

5 小结与展望

Pokemon 为 POK 家族成员之一,具有 BTB/POZ 结构域和 Kruppel 锌指结构,参与多种组织细胞的分化、增殖和凋亡的调控;为 ARF 特异性转录抑制剂,与肿瘤发生密切相关,其作用位点位于抑癌基因和原癌基因的上游,因此可作为肿瘤治疗的一个有效靶点。

目前,对于 Pokemon 基因生物学功能的了解仍处于初步阶段,虽然有报道 Pokemon 在人类多种肿瘤中异常表达,但在肿瘤中表达机制及作用机制还所知甚少;以 Pokemon 基因为靶点的基因治疗还处于初步研究阶段,随着研究的进一步深入,有可能为肿瘤的诊断和治疗提供新的途径和方法。

参考文献:

- [1] Yang Y, Zhou X, Zhu X, et al. Cloning and functional analysis of 5'-upstream region of the Pokemon gene[J]. FEBS J, 2008, 275(8): 1860-1873.
- [2] Maeda T, Hobbs RN, Merghoub T, et al. Role of the proto-oncogene Pokemon in cellular transformation and ARF repression[J]. Nature, 2005, 433(7023): 278-285.
- [3] Maeda T, Hobbs RM, Pandolfi PP. The transcription factor Pokemon: a new key player in cancer pathogenesis[J]. Cancer Res, 2005, 65(19): 8575-8578.
- [4] Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, et al. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest[J]. Cell, 1995, 83(6): 993-1000.
- [5] Choi WI, Jeon BN, Yun CO, et al. Proto-oncogene FBI-1 Represses Transcription of p21CIP1 by Inhibition of Transcription Activation by p53 and Sp1[J]. J Biol Chem, 2009, 84(19): 12633-12644.
- [6] Jeon BN, Yoo JY, Choi WI, et al. Proto-oncogene FBI-1

- (Pokemon/ZBTB7A) represses transcription of the tumor suppressor Rb gene via binding competition with Sp1 and recruitment of co-repressors[J]. J Biol Chem, 2008, 283(48): 33199 - 33210.
- [7] Kamijo T, Bodner S, van de Kamp E, et al. Tumor spectrum in ARF-deficient mice [J]. Cancer Res, 1999, 59(9): 2217 - 2222.
- [8] Yoon HG, Chan DW, Reynolds AB, et al. N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso[J]. Mol Cell, 2003, 12(3): 723 - 734.
- [9] Pintard L, Willems A, Peter M, et al. Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family[J]. EMBO J, 2004, 23(8): 1681 - 1687.
- [10] Roh HE, Lee MN, Jeon BN, et al. Regulation of Pokemon 1 activity by sumoylation [J]. Cell Physiol Biochem [J]. 2007, 20(1-4): 167 - 180.
- [11] Hoatlin ME. Zhi Y, Ball H, et al. A novel BTB/POZ transcriptional repressor protein interacts with the Fanconi anemia group C protein and PLZF[J]. Blood, 1999, 94(11): 3737 - 3747.
- [12] Morrison DJ, Pendergrast PS, Stavropoulos P, et al. FBI, a factor that binds to the HIV 1 inducer of short transcripts (IST), is a poz domain protein [J]. Nucleic Acid Res, 1999, 27(5): 1251 - 1262.
- [13] Lee DK, Kang JE, Park HJ, et al. FBI-1 enhances transcription of the nuclear factor-kappaB (NF-kappaB)-responsive E-selectin gene by nuclear localization of the p65 subunit of NF-kappaB [J]. J Biol Chem, 2005, 280(30): 27783 - 27791.
- [14] Aggarwal A, Hunter WJ 3rd, Aggarwal H, et al. Expression of leukemia/lymphoma-related factor (LRF/Pokemon) in human breast carcinoma and other cancers[J]. Exp Mol Pathol, 2010, 89(2): 140 - 148.
- [15] 李喜霞,郎旭宇,乔从进,等. 原癌基因 Pokemon mRNA 及其蛋白在非小细胞肺癌中的表达和意义[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2009, 18(1): 89 - 92.
- [16] 崔明,徐海,杨彦. Pokemon 蛋白在乳腺癌中的表达及意义[J]. 临床外科杂志,2007, 15(6): 399 - 401.
- [17] 高伟,隋军,李晓江,等. Pokemon 在鼻咽癌中的表达及临床意义[J]. 现代肿瘤医学,2009, 17(1): 37 - 41.
- [18] He S, Liu F, Xie Z, et al. P-Glycoprotein/MDR1 Regulates Pokemon Gene Transcription Through p53 Expression in Human Breast Cancer Cells[J]. Int J Mol Sci, 2010, 11(9): 3309 - 3351.
- [19] Choi WI, Kim Y, Kim Y, et al. Eukaryotic translation initiator protein 1A isoform, CCS-3, enhances the transcriptional repression of p21CIP1 by proto-oncogene FBI-1 (Pokemon/ZBTB7A) [J]. Cell Physiol Biochem, 2009, 23(4-6): 359 - 370.
- [20] Polisenio L, Pittot L, Simili M. The proto-oncogene LRF is under post-transcriptional control of MiR-20a: implications for senescence[J]. PLoS One, 2008, 2; 3(7): 2542.
- [21] Davies JM, Hawe N, Kabarowski J, et al. Novel BTB/POZ domain zinc-finger protein, LRF, is a potential target of the LAZ-3/BCL-6 oncogene [J]. Oncogene, 1999, 18(2): 365 - 375.
- [22] Weiwei M, Zhenhua X, Feng L, et al. A significant increase of RNAi efficiency in human cells by the CMV enhancer with a tRNAlys promoter [J]. J Biomed Biotechnol, 2009, 2009(25): 514287.
- [23] Tian Z, Wang H, Jia Z, et al. Tumor-targeted inhibition by a novel strategy - mimoretrovirus expressing siRNA targeting the Pokemon gene [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2010, 10(8): 932 - 941.

(修回日期:2012-04-05)

(上接第238页)

- [11] Jeon HC, Choi M, Paik SH, et al. Treatment of keratoacanthoma with 5% imiquimod cream and review of the previous report[J]. Ann Dermatol, 2011, 23(3): 357 - 361.
- [12] Mngas C, Bielsa I, Ribera M, et al. A case of multiple keratoacanthoma centrifugum marginatum [J]. Dermatol Surg, 2004, 30(5): 803 - 806.
- [13] Piyush B, Borkhatariya, Shweta Gupta, et al. Keratoacanthoma centrifugum marginatum: case report and review of literature[J]. Indian J Dermatol, 2011, 56(4): 455 - 456.

(修回日期:2012-03-01)